

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平4-169178

⑫ Int.Cl.

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)6月17日

C 12 N 1/20  
// C 12 P 3/00  
(C 12 N 1/20  
(C 12 R 1:145)  
(C 12 P 3/00  
(C 12 R 1:145)

A  
Z

7236-4B  
8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全20頁)

⑭ 発明の名称 水素ガス產生細菌

⑮ 特 願 平2-295383

⑯ 出 願 平2(1990)11月2日

⑰ 発 明 者 田 口 文 章

神奈川県相模原市陽光台5-14-1

⑰ 発 明 者 森 本 昌 義

東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内

⑰ 発 明 者 京 谷 健

東京都港区元赤坂1丁目2番7号 鹿島建設株式会社内

⑰ 発 明 者 鷹 野 幹 雄

東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内

⑰ 出 願 人 田 口 文 章

神奈川県相模原市陽光台5-14-1

⑰ 出 願 人 鹿 島 建 設 株 式 会 社

東京都港区元赤坂1丁目2番7号

⑰ 代 理 人 弁理士 戸 田 親 男

(57)【要約】本公報は電子出願前の出願データであるため要約のデータは記録されません。

(3)

⑩ 日本国特許庁 (JP)      ⑪ 特許出願公開  
 ⑫ 公開特許公報 (A)      平4-169178

⑬ Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	⑭ 公開 平成4年(1992)6月17日
C 12 N 1/20	A	7236-4B	
// C 12 P 3/00	Z	8114-4B	
(C 12 N 1/20			
(C 12 R 1:145)			
(C 12 P 3/00			
C 12 R 1:145)			

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全20頁)

⑮ 発明の名称 水素ガス產生細菌

⑯ 特 願 平2-295383  
 ⑰ 出 願 平2(1990)11月2日

⑱ 発明者 田口 文章	神奈川県相模原市陽光台5-14-1
⑲ 発明者 森本 昌義	東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内
⑳ 発明者 京谷 健	東京都港区元赤坂1丁目2番7号 鹿島建設株式会社内
㉑ 発明者 鷹野 幹雄	東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内
㉒ 出願人 田口 文章	神奈川県相模原市陽光台5-14-1
㉓ 出願人 鹿島建設株式会社	東京都港区元赤坂1丁目2番7号
㉔ 代理人 弁理士 戸田 親男	

## 明細書

1. 発明の名称 水素ガス產生細菌

2. 特許請求の範囲

- 1) クロストリジウム属に属する水素ガス產生細菌。
- 2) 别掲表1-1、表1-2、表1-3に記載された一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス產生細菌。
- 3) AM14A-2株(農工研西寄第11793号)、AM37E株(同、第11794号)、AM21B株(同、第11795号)、AM9A-2株(同、第11800号)、AM37F株(同、第11799号)、AM40A株(同、第11798号)、AM18B株(同、第11796号)、AM38C-1株(同、第11797号)およびAM42E株(同、第11801号)より選択される水素ガス產生細菌。

3. 発明の詳細な説明

## 【技術分野】

本発明は、水素ガスの產生率に関するものであり、詳しくは、シロアリより単離された新規な水素ガス產生菌を提供するものである。

## 【背景技術】

現代工業社会においては、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料が大量に消費され、その化石燃料は、燃焼により多量のNO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub>およびCO<sub>2</sub>などを排出し、その結果、環境汚染、酸性雨、地球の温暖化などの諸問題を引き起している。更には、その埋蔵量が有限で近い将来枯渇するといわれ、重要な社会問題ともなっている。

これらのことから、化石燃料に代わる環境汚染のない新しいクリーンなエネルギー源が世界的に求められており、石油に代わる次世代のエネルギー源として、現在、アルコール及びメタンガスが注目されている。しかし、アルコールやメタンガスは、いずれも燃焼により大量にCO<sub>2</sub>を生成する点では、依然として問題があり、しかも、その内在エネルギーはロケットや航空機用の燃料に使用し得るほど高いものではないという欠点を有している。

ところで、水素ガスは、単位重量当たりの燃焼による発熱エネルギーが石油の3倍もあり、し

## (5)

AM37F株、AM40A株、AM18B株、AM38C-1株およびAM42E株より選択される水素ガス產生細菌を提供するものである。

上記のAM14A-2株、AM37E株、AM21B株、AM9A-2株、AM37F株、AM40A株、AM18B株、AM38C-1株およびAM42E株は、工業技術院微生物工業研究所において、農工研函等第11793号、同、第11794号、同、第11795号、同、第11800号、同、第11799号、同、第11798号、同、第11796号、同、第11797号および同、第11801号として寄託されている。

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明者は、イエシロアリ(*Termites formosanus*)を生きた状態のままで窒息死させ、後に鮮速する操作を経て、嫌気性細菌を分離した。細菌の分離培養用培地として普通ブイヨン(日本水産株式会社製)を通常の50分の1に選択した培養液(以下1/50Nと略記する)にメタンガスの基質である鉛隕ソーダと水素ガスの基質であ

## 特開平4-169178 (3)

る鉛隕ソーダとをそれぞれ2.5g/100ml加えて調整した培養液(以下1/50Nと略記する)を考定して用いた。また、この1/50Nに1.5%の糊に寒天を加えた貯糞槽1/50N寒天培地を調製した。次に培養条件として、将來エネルギー回収型の廃液処理にも応用することを考慮し、35℃での嫌気性格養を用いることにした。

イエシロアリから嫌気性細菌を効率よく分離培養するために、極力酸素との接触を避けることに留意し、そのために、糞より取り出した生きているイエシロアリをベトリー皿に入れ、それを嫌気性培養器(グローブボックス、米国フォーマ社製)内に納め、嫌気性混合ガス( $\text{H}_2$  10%、 $\text{CO}_2$  10%、 $\text{N}_2$  80%)の雰囲気下で貯糞元させた。このイエシロアリをすりつぶすことなく、シロアリ10匹を1/50N寒天培地20mlに加え、充分に混和して固化させた。この操作によって、シロアリが寒天中に埋設した状態となり混合ガスにもあまり接触しない条件が作り出された。

この寒天平板10枚を嫌気性混合ガスの雰囲気

下で35℃で3週間培養を行った。

次いで、細菌学的な分離操作により153株の細菌を単離し、その153株の細菌の水素ガス產生能をスクリーニング法により検定した結果、93%に相当する141株が水素ガスを产生することが見出された。次いで酸素要求性試験を行った結果、8株が過性嫌気性細菌であった。最終的には、目的に適う貯糞槽37株の分離に成功した。

現在までに分離された微生物の中で、最も効率よく水素ガスを产生する微生物は、前述したとおり、*Enterobacter aerogenes* E82005株とされているが、この菌株は11500 R<sub>s</sub>/d-medium·hr又は246nd R<sub>s</sub>/d-medium·hrの水素ガスを产生するのに対し、本発明者が単離した菌株のうち、9株は、これをはるかに超える水素ガス產生能を有する。

これら9株の一般的性状、生化学的性状、酵素活性を表1-1、表1-2及び表1-3に示す。

(7)

特開平4-169178 (5)

表1-3 飽和性

菌株名	URE	BLTS	$\alpha$ ARA	ONPG	$\alpha$ GLU	$\beta$ GLU	$\alpha$ GAL	$\alpha$ FUC	NAG	PO4	LGT	CLY	PRO	PAL	ARG	SER	PYR	IND
AM9A-2	-	-	±	±	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM38C-1	-	-	±	±	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM40A	-	-	±	±	+	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37F	-	-	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM42E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM14A-2	-	-	±	+	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM21B	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37E	-	-	-	-	+	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM18B	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Rap ANA II Systems

(Substance)

URE	Urea
BLTS	p-Nitrophenyl-B, D-disaccharide
$\alpha$ ARA	p-Nitrophenyl-a, L-arabinoside
ONPG	o-Nitrophenyl-B, D-galactoside
$\alpha$ GLU	p-Nitrophenyl-a, D-glucoside
$\beta$ GLU	p-Nitrophenyl-B, D-glucoside
$\alpha$ GAL	p-Nitrophenyl-a, L-fucoside
$\alpha$ FUC	p-Nitrophenyl-a, L-fucoside
NAG	p-Nitrophenyl-N-acetyl-B, D-glucosaminide
PO4	p-nitrophenylphosphate
LGT	Leucyl-glycine-B-naphthylamide
GLY	Glycine-B-naphthylamide
PRO	Proline-B-naphthylamide
PAL	Phenylalanine-B-naphthylamide
ARG	Arginine-B-naphthylamide
SER	Serine-B-naphthylamide
PYR	Pyrrolidonyl-B-naphthylamide
IND	Tryptophane

(Enzyme activities)

$\beta$ -Galactosidase
$\alpha$ -Glucosidase
$\beta$ -Glucosidase
$\alpha$ -Galactosidase
$\alpha$ -Fucosidase
N-Acetylglucosaminidase
Alkaline phosphatase
Leucylglycine aminopeptidase
Glycine aminopeptidase
Proline aminopeptidase
Phenylalanine aminopeptidase
Arginine aminopeptidase
Serine aminopeptidase
Pyrrolidone aminopeptidase
Tryptophanase(indole production)

注: ⊕印は複数で強い

これらの各菌株の性状 (API 20A, Rap ANA II systemsによる) より、AM21BはClostridium beijerinckii, AM37EとAM14A-2はClostridium butyricumと同定された。AM38C-1, AM42E及びAM18Bの3菌株はClostridium属と考えられるが、これまで知られていない新しい細菌である。さらに、AM37F, AM9A-2及びAM40Aの3株は、未定不能な全く新しい水素産生菌である。更に詳細に言えば、AM37F, AM9A-2及びAM40Aのように、グラム陽性、桿菌、無芽胞性嫌気性細菌で水素ガスを産生する細菌については、これまで全く報告されておらず、例を見ないものである。これらの3菌株は、世界で初めて見出された細菌である。

これら菌株のガム東天の高層斜面培地におけるガス産生性能を表1-4に示す。

表1-4 ガム東天の高層斜面培地におけるガス産生能

菌株名	好気培養		嫌気培養	
	増殖	ガス産生	増殖	ガス産生
AM 9A-2	-	-	+	+
AM 14A-2	-	+	+	+
AM 18B	-	+	+	+
AM 21B	-	+	+	+
AM 37E	-	+	+	+
AM 37F	-	+	+	+
AM 38C-1	-	+	+	+
AM 40A	-	+	+	+
AM 42E	-	+	+	+

ガム東天の高層斜面培地を用いて36~24時間培養

よど、人工糞水におけるガス産生能を表1-5に示す。

(9)

特開平4-169178 (7)

培養し、発生する水素ガスの量を1時間毎に測定した。結果は表1-7に示すとおりであった。

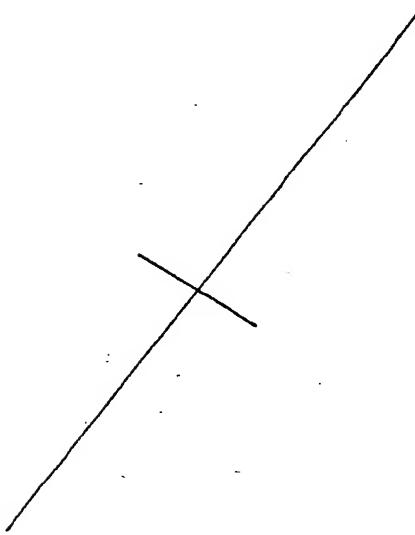


表1-7 ガス生成量 (ml)

培養時間 (hr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	総計
1%グルコース イヨン	0	0	0	170	425	605	520	425	350	270	230	150	3145
0.3%グルコース イヨン	0	0	0	10	125	130	270	495	240	50	30	0	1350

## 実施例2 人工汚水からの水素ガスの產生

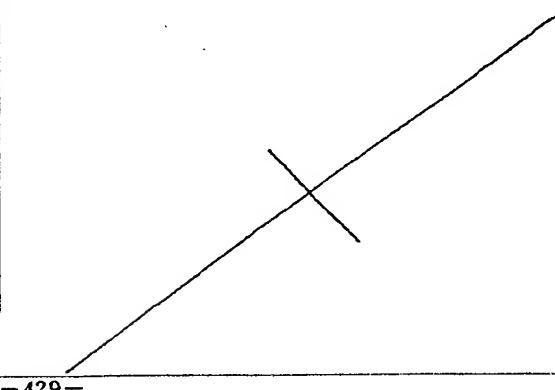
0.3%グルコース加普通ブイヨン(日本製葉葉)とガムブイヨン培地(日本製葉葉)の各300mlに各菌を接種して、36°Cで1液槽式培養した。発生されたガス量と水素ガス濃度より水素ガス產生量を算出した。結果は表1-8に示すとおりであった。

表1-8

菌株名	ガス產生量(ml)		ガス組成(%)			H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
	C培地	N <sup>o</sup> 培地	G/NP	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>			
AM38C-1	770	365	2.1	51.1	26.2	393	201	2.0
AM18B	850	360	2.4	40.2	19.9	357	171	2.2
AM9A-2	640	320	2.0	46.7	26.5	299	170	1.8
AM37F	730	355	2.0	40.7	18.0	297	131	2.3
AM37E	640	330	1.9	38.6	22.1	285	143	2.0
AM42E	630	250	2.5	44.4	16.2	280	102	2.8
AM21B	750	145	5.2	37.5	17.9	281	134	2.1
AM40A	600	230	2.6	42.5	21.7	255	130	2.0
AM14A-2	450	110	4.1	44.6	19.6	200	88	2.3

## 実施例3 新規な水素ガス產生菌による水素ガス產生

人工汚水としてのガムブイヨン(B水製葉葉)培地900mlに各培養菌液100mlを添加し攪拌して培養した。1時間毎にガス產生量、菌量(OD)、pH及び無機炭を測定し、ガス產生量が200ml以上の場合のガスの組成分析を行った。ガス產生量とガス濃度から、水素ガスの產生量を算出し、培養時間と水素ガス產生量の関係を検討した。表1-9はその結果を示すものである。



(11)

## 特開平4-169178 (9)

表1-9(続)

培養時間 (h)	ガス 生成量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(mL) CO <sub>2</sub> :H <sub>2</sub>	重量 (gD)	pH	電導度 (mS/Ω)
		H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> :H <sub>2</sub>				
AH40A	0	0	—	—	—	6.26	6.81
	1	20	—	—	—	6.84	6.50
	2	310	40.5	11.3	125	35	2.08
	3	510	48.1	29.4	245	150	2.84
	4	440	51.6	29.7	230	151	3.10
	5	390	52.2	27.1	158	94	3.28
	6	280	33.4	24.1	94	76	3.28
Total		2020	—	—	488	—	—

AH37E	0	0	—	—	—	0.78	6.73	300
	1	20	—	—	—	1.15	6.43	240
	2	80	—	—	—	2.00	5.95	145
	3	390	37.3	20.2	160	87	3.28	5.31
	4	1200	43.0	20.3	550	259	4.24	5.04
	5	210	33.1	24.6	56	42	4.24	5.01
	6	20	—	—	—	4.32	5.01	80
Total		2000	—	—	766	368	—	—

以上、述べたところから明らかのように、本発明に係る新規な水素ガス產生菌は、水素ガスの工業的製造法あるいは廃水処理、廃棄物処理に有用な優れた活性を有し、産業上極めて価値ある微生物である。

## 4. 四国の簡単な説明

添付第1図は、本発明に係る新規微生物のガス產生量を測定するために使用した装置の1例を示すものである。

特許出願人 田口文章

特許出願人 鹿島建設株式会社

代理人 弁理士 南幸夫

代理人 弁理士 川上宜男



手続補正書

平成3年6月5日

特許庁長官 聞

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第295383号

## 2. 発明の名称

水素ガス產生菌

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 神奈川県相模原市陽光台5-14-1

氏名 田口文章 (ほか1名)

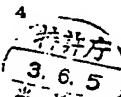
## 4. 代理人

住所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号

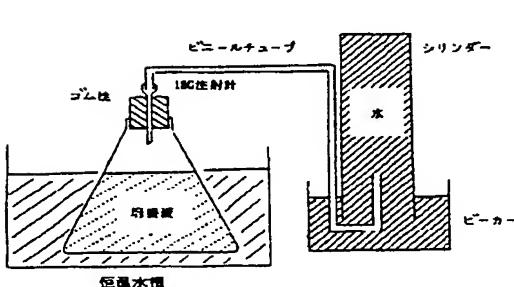
邦楽ビル503

氏名 弁理士(7577)戸田頼男

電話 3508-0333



## 5. 補正により増加する請求項の数



(13)

## 特開平4-169178 (11)

し得るほど高いものではないという欠点を有している。

そこで、水素ガスが注目されるようになった。水素ガスは、単位重量当りの燃焼による発熱エネルギーが石油の3倍もあり、しかも、燃焼による副生物が $H_2O$ のみであることから、次世代の理想的なクリーンエネルギー源として期待されるからである。

しかしながら、現状での水素ガスの工業的製法は、水の電気分解や液化プロパン(LPG)、アルコールの高圧熱分解などの方法によっているため、これらは方法は、そのエネルギー源として化石燃料を消費するものであるから、製造法におけるエネルギー源の問題が解決されない限り前述した環境汚染などの課題の基本的解決にはならない。

そこで微生物が着目され、微生物による水素ガスの産生に関する研究がいくつか試みられてきた。たしかに、微生物により水素ガスを生産するという方法が確立されるとすれば、その方法の利点は、反応が常温、常圧で行なわれるから、システム構

*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*、嫌気性細菌の *Clostridium butyricum* 等がある。

たしかに、このように微生物による水素ガスの産生は、水素ガスの製造方法として、極めて優れた利点を有してはいるが、従来の研究実績においては、未だそれを工業的な製造方法として確立するにはほど遠い状況にある。特に、これまでに行われている研究では、工業的な生産を可能にするほどの水素ガスの生産性の高い微生物は見出されておらず、したがって、現状では微生物を利用して水素ガスを工業的に製造する方法については、全く未開発の状況にある（福井三郎ほか監修「バイオテクノロジー事典」(株) シーエムシー(1986-10-9) p.601-602)。

## 〔発明が解決しようとする課題〕

上記のように微生物による水素ガスの生産技術は、未だ工業的レベルにまでは達していない。

従来既知の微生物は、いずれも、水素ガスの生産効率自体が低いだけでなく、これらの微生物の内、光合成微生物については、それによる水素ガ

成が簡単であり、また、エネルギー消費も極めて少ないとということであり、しかも、再生可能なバイオマスを水素ガス産生の原料として使用するものであって、このバイオマスはもともと太陽エネルギーを変換したものであるので自然エネルギーの有効利用であることになる。更にまた、微生物による水素ガスの産生には、通常、廃棄物または廃液中に存在する有機物質を原料とすることが可能であるので、廃液の効率的処理による環境浄化の問題の解決にもなるという利点がある。

上記のように微生物による水素ガスの産生に関する研究がいくつか行われた結果、水素ガスを産生する微生物が若干発見された。

これらのこれまでに知られている、水素ガスを産生する微生物は、大別すると、光合成微生物と非光合成細菌とに分けられる。前者には、光合成細菌の *Rhodobacter sphaeroides*、藍藻の *Oscillatoria sp. Miami BG7* があり、後者には、窒素固定細菌の *Azotobacter chroococcum*, *Klebsiella pneumoniae*、通性嫌気性細菌の

の産生には、光エネルギーを利用するに、表面積の広い培養槽と多量の水を必要とする。

他方、非光合成細菌による水素ガスの産生は、小規模の発酵槽によても可能であり、地下に設置するなど、その設置場所の選択肢が広いなどの利点があり、水素ガスの産生には、非光合成細菌による方が光合成微生物によるよりも有利であると考えられる。

現在までに単離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、Tanisho S.らが単離したエンテロバクター アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) E82005株であるとされている (Tanisho S., et al. Int. J. Hydrogen Energy 12 623, 1987; Biochim. Biophys. Acta. 973 1 1989)。しかし、この菌株は、通性嫌気性細菌であり、嫌気状態でも増殖するが、好気性条件下でより活性に増殖するため、発酵槽内で大量の水素が産生されると、槽内を好気的に維持することが困難になり、水素ガスの工業的生産には適さない。

(15)

特開平4-169178 (13)

させた。この操作によって、シロアリが寒天中に埋設した状態となり混合ガスにもあまり接触しない条件が作り出された。

この寒天平板10枚を嫌気性混合ガスの雰囲気下で35°Cで3週間培養を行った。

次いで、細菌学的な分離操作により153株の細菌を単離し、その153株の細菌の水素ガス産生能をスクリーニング法により検定した結果、93%に相当する141株が水素ガスを産生することが見出された。次いで酸素要求性試験を行った結果、8株が通性嫌気性細菌であった。最終的には、目的に適う候補菌37株の分離に成功した。

現在までに分離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、前述したとおり、*Enterobacter aerogenes* E82005株とされているが、この菌株は11mmol H<sub>2</sub>/2-medium.hr又は246ml H<sub>2</sub>/2-medium. hrの水素ガスを産生するのに対し、後記するところからも明らかなように本発明者が単離した菌株のうち、9株は、これではるかに超える水素ガス産生能を有する点できわ

めて特徴的である。

これら9株の一般的性状、生化学的性状、酵素活性を表1-1、表1-2及び表1-3に示す。

性状	菌株名 <sup>5</sup>					(V)
	(イ)	(ロ)	(ハ)	(ニ)	(ホ)	
グラム染色 <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+
形態 <sup>2</sup>	1/50N	1/50N*				
運動性	N	N*	N	N	N	
芽胞 <sup>3</sup>						
集落の大きさ径 <sup>(mm)</sup>	3~5	5	3~6	6	3~6	6
嫌気要求性 <sup>4</sup>						
増殖						

\*1: +はグラム陽性  
\*2:すべて杆状である  
\*3: +は芽胞陽性  
\*4: すべて嫌気性である

\*5: (イ)はAM16A-2  
(ロ)はAM37E  
(ハ)はAM210  
(ニ)はAM9A-2  
(ホ)はAM42E  
(ヘ)はAM10A  
(ト)はAM18I  
(チ)はAM38C-1  
(V)はAM57F

(17)

特開平4-169178 (15)

これらの各菌株の性状 (API 20A, Rap ANA II systemによる) より、AM21Bは*Clostridium beijerinckii*, AM37EとAM14A-2は*Clostridium butyricum*と同定された。AM38C-1, AM42E及びAM18Bの3菌株は*Clostridium*属と考えられるが、これまで知られていない新規な細菌である。さらに、AM37F, AM9A-2及びAM40Aの3株は、同定不能な全く新しい水素産生菌である。更に詳細に言えば、AM37F, AM9A-2及びAM40Aのように、グラム陰性、桿菌、無芽胞性嫌気性細菌で水素ガスを産生する細菌については、これまで全く報告されておらず、例をみないものである。これらの3菌株は、世界で初めて見出された新規細菌である。

これら菌株のガム寒天の高層斜面培地におけるガス産生性能を表1-4に示す。

表1-4

ガム寒天の高層斜面培地におけるガス産生能

菌株名	好気培養		嫌気培養	
	増殖	ガス産生	増殖	ガス産生
AM 9A-2	-	-	+	+
AM 14A-2	-	+	+	+
AM 18B	-	+	+	+
AM 21B	-	+	+	+
AM 37E	-	+	+	+
AM 37F	-	+	+	+
AM 38C-1	-	+	+	+
AM 40A	-	+	+	+
AM 42E	-	+	+	+

ガム寒天の高層斜面培地を用いて35°C 24時間培養

また、人工汚水におけるガス産生能を表1-5に示す。

表1-5

人工汚水によるガス産生能

菌株名	人工汚水							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
AM 9A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 14A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 18B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 21B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37E	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37F	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 38C-1	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 40A	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 42E	-	±	+	±	+	+	+	+

(1) N: 普通ブイヨン(日本製薬製)

(2) NY: 0.5%イーストエキストラクト(日本製薬製) 加N

(3) ND: 0.3%グルコース加N

(4) PY: 0.5%ペプトンヒイーストエキストラクト

(5) PYG: 1%グルコース加PY

(6) PYS: 1%酵母加PY

(7) GAM: ガムブイヨン(日本製薬製)

(8) K-meet: クックドミート培地(日本製薬製)

+は、ガス産生量がゲーラム管の1/2程度

士は、ガス産生量がゲーラム管の1/5程度

ガス産生量の測定は、添付図面第1図に示す装置を用いて行った。

すなわち、培養ビンの口を密栓したゴム栓に18号注射針を刺し通し、そこにビニールチューブをつなぎ、この排気管をガス測定用シリンドラーに接続した。培養後、逆さにしたシリンドラーに溜まったガス産生量を測定した。

前記したとおり、*Enterobacter aerogenes* E82005株の水素ガス産生能は246ml/l·hrであるのに對し、本発明者がイエシロアリより分離に成功した前記の9菌株の水素産生能は、表1-6に示すようにE82005株と比較して全く比較にならないほど大量の水素ガスを産生し、従来菌に比してその10倍以上も産生する菌株も認められ、これらの菌株は工業的用途に充分使用可能であることが実証

(19)

特開平4-169178 (17)

**実施例2 人工汚水からの水素ガスの產生**  
 0.1%グルコース加普通ブイヨン(日本製薬製)とガムブイヨン培地(日本製薬製)の各300mlに各菌を接種して、36℃で1夜静置培養した。產生されたガス量と水素ガス濃度より水素ガス產生量を算出した。結果は表1-8に示すとおりであった。

表1-8

菌株名	ガス產生能(ml)		G/N	組成(%)		產生量(ml)	$H_2/CO_2$
	G培地	N培地		$H_2$	$CO_2$		
AM38C-1	770	365	2.1	51.1	26.2	393	201
AM188	650	360	2.4	40.2	19.9	357	171
AM9A-2	640	320	2.0	46.7	26.5	299	170
AM37F	730	355	2.0	40.7	18.0	297	131
AM37E	640	330	1.9	38.6	22.1	285	143
AM42E	630	250	2.5	44.4	16.2	280	102
AM21B	750	145	5.2	37.5	17.9	281	134
AM40A	600	230	2.6	42.5	21.7	255	130
AM14A-2	450	110	4.1	44.5	19.6	200	88

**実施例3 新規な水素ガス產生菌による水素ガス產生**

人工汚水としてのガムブイヨン(日本製薬製)培地300mlに各培養菌液100mlを添加し攪拌して培養した。1時間毎にガス產生量、菌量(OD)、pH及び糖濃度を測定し、ガス產生量が200ml以上の場合のガスの組成分析を行った。ガス產生量とガス濃度から、水素ガスの產生量を算出し、培養時間と水素ガス產生量の関係を検討した。表1-9はその結果を示すものである。

時間(h)	ガス產生量(ml)		菌量 (OD)	組成 (%)		糖濃度 (mg/dl)		
	(H <sub>2</sub> )	(CO <sub>2</sub> )		H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス			
				(H <sub>2</sub> )	(CO <sub>2</sub> )			
0	0	-	-	-	-	300		
1	110	-	-	-	-	216		
2	340	34.3	3.8	116	20	160		
3	710	50.4	6.1	271	60	7.64		
4	1200	63.5	22.4	761	268	1.58		
5	800	45.2	27.9	261	233	4.33		
6	200	26.2	49.9	56	100	4.40		
Total	3190	-	-	1659	672	-		
AM35C-1	0	-	-	-	-	300		
1	110	36.7	12.3	120	36	0.32		
2	500	52.0	21.0	468	169	1.50		
3	1100	60.1	30.8	725	370	3.08		
4	470	41.1	30.7	159	144	3.20		
5	70	-	-	-	-	3.70		
6	60	-	-	-	-	4.24		
Total	3010	-	-	1511	761	-		
AM37F	0	-	-	-	-	300		
1	120	-	-	-	-	1.26		
2	560	52.1	25.6	303	146	2.73		
3	1440	56.6	34.1	815	491	3.80		
4	380	51.8	31.0	201	121	4.38		
5	180	-	-	-	-	4.38		
6	60	-	-	-	-	5.07		
Total	2760	-	-	1334	760	-		

(21)

特開平4-169178 (19)

## 手続補正書

平成 3年10月29日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成 2年特許願第295383号

## 2. 発明の名称

水素ガス產生菌

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 神奈川県相模原市陽光台5-14-1

氏名 田口文章 (ほか1名)

## 4. 代理人

住所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号

邦泰ビル503

氏名 弁理士(7577) 戸田 順男

電話 3508-0333



3.10.2!

## 5. 補正により増加する請求項の数 なし

## 6. 補正の対象

受託証及び明細書

## 7. 補正の内容

- (1) 受託証2通を別紙のとおり補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
- (3) 明細書10頁10~12行に  
〔同、第11795号……第11798号〕  
とあるを、  
『微研桑寄第3592号、微研桑寄  
第11800号、微研桑寄第3593号、  
微研桑寄第11798号』  
と補正する。
- (4) 明細書23頁9~10行に  
〔(FERM P-11795)〕とあるを、  
〔(FERM BP-3592)〕と補正する。

## 7. 特許請求の範囲

- 1) シロアリ由来の水素ガス產生菌。
- 2) 窒息死せしめたシロアリを寒天培地で固化した後これを嫌気性ガス雰囲気下で培養し、それから分離して得たことを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス產生菌。
- 3) シロアリがイエシロアリ (*Termites formosanus*) であり、寒天培地が酢酸塩及びギ酸塩を含有することを特徴とする、請求項2のシロアリ由来の水素ガス產生菌。
- 4) クロストリジウム (*Clostridium*) 属に属するものであることを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス產生菌。
- 5) クロストリジウム (*Clostridium*) 属の菌学的性質を有するが芽胞形成能を欠くことを特徴とする微生物群に属する水素ガス產生菌。
- 6) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載された一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス產生菌。

**Partial Translation of JP 4(1992)-A-169178**

**BACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING HYDROGEN GAS**

**(I) CLAIMS**

1. A bacterium which belongs to the genus *Clostridium* and is capable of producing hydrogen gas.
2. A hydrogen-producing bacterium having general, biochemical, and enzymatic properties as shown in the separate Tables 1-1, 1-2 and 1-3.
3. A bacterium selected from the group consisting of AM14A-2 strain (FERM-P11793), AM37E strain (FERM-P11794), AM21B strain (FERM-P1195), AM9A-2 strain (FERM-P11800), AM37F strain (FERM-P11799), AM40A strain (FERM-P11798), AM18B strain (FERM-P11796), AM38C-1 strain (FERM-P11797) and AM42E strain (FERM-P11801).

**(II) On page 5, left column**

Based on the properties of these strains (according to API 20A, Rap ANA II system), AM21B was identified to be *Clostridium beijerinckii*, and AM37E and AM14A-2 were identified to be *Clostridium butyricum*. AM38C-1, AM42E and AM18B are considered to belong to the genus *Clostridium* and are novel bacteria hitherto unknown. Furthermore, AM37F, AM9A-2 and AM40A are quite new hydrogen-producing bacteria which are impossible to identify. In more detail, any bacteria that are anaerobic sporeless gram-positive rods and capable of producing hydrogen gas such as AM37F, AM9A-2 and AM40A have not heretofore been reported at all and are quite novel. These three strains are bacteria found first in the world.

Gas productivities of these strains on multi-layered GAM agar slant are shown in Table 1-4.

(III) On page 8, Table 1-6

Table 1-6: Hydrogen Productivity (mL H<sub>2</sub>/L-hr)

E. aerogenes E82005	246	1.0
AM37F	2,790	11.3
AM21B	2,515	10.2
AM38C-1	2,396	9.7
AM42E	2,380	9.7
AM18B	1,898	7.7
AM37E	1,815	7.4
AM9A-2	1,501	6.1
AM14A-2	1,478	6.0
AM40A	759	3.1

(IV) On page 12, lower left column, line 15 to right column, line 11

In order to carry out the present invention, it is necessary to first separate anaerobic bacteria from a termite. For such purpose, for example, Termites formosans is made to die from suffocation with the state where it is alive, and the target microbe is separated using a culture medium for separation containing an acetic acid salt and a formic acid salt (preferably an alkali (or alkaline earth) metal salt as the salt).

For example, the present inventors have found a culture medium for separating microbes and used it. Such culture medium was prepared by diluting a normal bouillon (available from Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) in 1:50 (hereinafter, the diluted medium is abbreviated to as 1/50N) and adding 2.5 g/L of sodium acetate as a substrate for methane gas and 2.5 g/L of sodium formate as a substrate for hydrogen gas, thereby to give a culture medium (hereinafter, abbreviated to as 1/50N<sup>+</sup>). Further, the present inventors have created a poor nutritious 1/50N<sup>+</sup> agar medium which was prepared by adding an agar to 1/50N<sup>+</sup> medium in a proportion of 1.5%. Next, as cultivation conditions,

anaerobic cultivation at 35°C was adopted in consideration of also applying it to energy recovery type waste fluid processing in the future.